

## Polymer blends containing polymer of beta -hydroxybutyric acid and chlorine or nitrile group containing polymer

Patent Number:  US4393167

Publication date: 1983-07-12

Inventor(s): HOLMES PAUL A [GB]; WILLMOUTH FRANK M [GB]; NEWTON ALAN B [GB]

Applicant(s): ICI PLC [GB]

Requested Patent:  JP57150393

Application Number: US19810320127 19811110

Priority Number (s): GB19800036967 19801118

IPC Classification: C08L27/06; C08L33/18; C08L67/04

EC Classification: C08G63/06, C08L67/04, C12P7/62A

Equivalents: DE3168826D,  EP0052460, B1, JP1782389C, JP1782493C, JP1888568C,  
 JP3149255, JP4069186B, JP4070342B,  JP57111349, JP6015604B

### Abstract

Polymer blends containing (i) 0.2-95% by weight of a high molecular weight beta -hydroxybutyric acid homo- or copolymer and (ii) a polymer containing at least 25% by weight of chlorine or nitrile groups, such as chlorinated polyethylene, polyvinyl chloride, or a high acrylonitrile resin. In small quantities the beta -hydroxybutyric acid polymer acts as a processing aid for the chlorine or nitrile containing polymer. In larger quantities the properties of the beta -hydroxybutyric acid polymer or the chlorine or nitrile containing polymer are improved.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

**BEST AVAILABLE COPY**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭57-150393

⑫ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 P 7/42  
C 08 G 63/06

識別記号

厅内整理番号  
6760-4B  
7919-4J

⑬ 公開 昭和57年(1982)9月17日  
発明の数 2  
審査請求 未請求  
(全 18 頁)

⑭ β-ヒドロキシブチレート重合体およびその  
製造法

⑮ 特 願 昭56-185153

⑯ 出 願 昭56(1981)11月18日

優先権主張 ⑭ 1980年11月18日 ⑮ イギリス  
(G B) ⑭ 8036967

⑰ 発明者 ポール・アーサー・ホルムズ  
イギリス国クリーブランド・ス  
トックトン・オン・ティーズ・  
ノートン・ザ・グリーン・ノー  
トン・ホール(番地なし)

⑱ 発明者 スチーブン・ヒュー・コリンズ

⑲ 出願人

⑳ 代 理 人 弁理士 湯浅恭三 外2名  
最終頁に続く

イギリス国クリーブランド・ス  
トックトン・オン・ティーズ・  
ノートン・ザ・グリーン・ノー  
トン・ホール(番地なし)  
インペリアル・ケミカル・イン  
ダストリーズ・ペエルシー  
イギリス国ロンドン市エスダブ  
リュー1ピー3ジエイエフ・ミ  
ルバンク・インペリアル・ケミ  
カル・ハウス(番地なし)

の炭素原子を含む基である特許請求の範囲第1項  
または第2項記載の共重合体。

(4)  $R^1, R^2, R^3$  および  $R^4$  の少なくとも一つが  
水素原子である特許請求の範囲第1項ないし第8  
項の何れかに記載の共重合体。

(5)  $R^1, R^2$  および  $R^4$  がそれぞれ水素原子であ  
る特許請求の範囲第4項記載の共重合体。

(6)  $R^1$  がエチル基である特許請求の範囲第1項  
ないし第5項の何れかに記載の共重合体。

(7) 重量平均分子量20000以上を有する特  
許請求の範囲第1項ないし第6項の何れかに記載  
の共重合体。

(8) 總返し単位を1ないし40モル%含む特許請求  
の範囲第1項ないし第7項の何れかに記載の共重  
合体。

(9) ポリエステルを蓄積できる微生物を、水溶性、  
同化性炭素含有基質の水性培地で、培養の少なく  
とも一部は微生物繁殖の必須条件の一つまたはそれ  
以上を制限するがポリエステル蓄積を制限しな  
い条件下で培養する熱可塑性ポリエステルの製造

明細書

1 [発明の名称]

β-ヒドロキシブチレート重合体およびその  
製造法

2 [特許請求の範囲]

(1) 重量平均分子量10000以上を有し、次の  
繰返し単位Iを99.9ないし50モル%  
 $-OCH(CH_3)CH_2CO-$  I

および次の繰返し単位IIを0.1ないし50モル%  
 $-OCR^1R^2(CR^3R^4)_nCO-$  II

(式中nは0または1、 $R^1, R^2, R^3$  および  $R^4$   
はそれぞれ炭化水素基；ハローまたはヒドロキシ  
-置換炭化水素基；ヒドロキシ基；ハログン原子  
および水素原子から選択するが、nが1のときは  
 $R^2, R^3$  および  $R^4$  はそれぞれ水素原子で、 $R^1$   
はメチル基ではない)  
を含む共重合体。

(2) nが1である特許請求の範囲第1項記載の共  
重合体。

(3)  $R^1, R^2, R^3$  および  $R^4$  はそれぞれ4個以下

法において、培養を制限した期間の少なくとも一部の間で、基質がこの制限された条件下で微生物により繰返し単位 $-OCH(CH_3)CH_2CO-$ のみとなる以外のポリエステルに代謝できる有機酸またはその塩よりなることを特徴とする方法。

- (10) 酸をプロピオン酸、脂肪酸およびアクリル酸より選択する特許請求の範囲第9項記載の方法。
- (11) 微生物繁殖の必須要件の一つまたはそれ以上を制限するが、ポリエステル蓄積を制限しない条件下で、微生物の培養を行う期間の少なくとも一部のとき、酸を唯一の基質とする特許請求の範囲第9項または第10項記載の方法。
- (12) 酸が微生物培養の全期間を通じての唯一の基質である特許請求の範囲第11項記載の方法。
- (13) 基質として炭化水素を用いて微生物を繁殖させる特許請求の範囲第9項をいし第11項の何れかに記載の方法。
- (14) 炭化水素がグルコースである特許請求の範囲第18項記載の方法。
- (15) 培養が微生物繁殖の必須要件の一つまたはそ

用するときには、しばしば欠点となる。

この発明により、PHBの結晶化は、直合体鎖に非類似单量体単位を組み入れることで変性できることが判明した。

下記の直合体合成を導く代謝経路の説明では、次の略号を用いた：

$C\bullet ASH$  は、末エステル化補酵素Aである。したがつて  $CH_3COSCoA$  は補酵素Aのアセチルチオエステルで、一般にアセチル  $C\bullet A$  と命名している。

$NADP$  は、酸化状態のニコチン酸アミドアデニジヌクレオチドである。 $NADPH_2$  は、還元した  $NADP$  である。

微生物によるPHBの生合成における第1工程は、アセチル  $C\bullet A$  の合成と考えられる。これは、例えば補酵素Aと酢酸エステル、またはビルベート[（炭水化物のグリコリシス（解糖）生成物またはオキサロアセテート（トリカルボン酸(TCA)サイクルまたはクレブサイクル）の一員である）の脱カルボキシル化で生成する]の脱カルボキシル化により形成される。

これ以上を制限するが、ポリエステル蓄積を制限しない条件下である期間の少なくとも一部での基質が、酸および炭水化物の混合物である特許請求の範囲第18項または第14項記載の方法。

- (16) 制限する繁殖の必須要件であるポリエステル蓄積には必須要件でないのは、空素源である特許請求の範囲第9項をいし第15項の何れかに記載の方法。

### 【発明の詳細を説明】

この発明は、ポリマー-ヒドロキシ酪酸（以下PHBと略記する）に関するもの。

PHBは、微生物細胞内部で粒子状のエネルギー貯蔵物質として、種々の微生物、主としてバクテリアにより蓄積される。

このような細胞から抽出したPHBは、次の繰返し単位の熱可塑性ポリエステルであり、



急速に比較的高いレベルまで結晶化し、例えば70%またはそれ以上のオーダーである。この結晶化率は、重合体を例えば成形用材料として使用するときには、しばしば欠点となる。

したがつて、アセチル  $C\bullet A$  としての酢酸エステルで、PHBは次の反応を含む代謝経路で製造される：

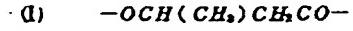
- (1)  $CH_3COO^- + C\bullet ASH \xrightarrow{\text{オキナーゼ}} CH_3COSCoA + OH^-$
- (2)  $2 CH_3COSCoA \xrightarrow{\text{β-ケトテオラーゼ}} CH_3COCH_2COSCoA + C\bullet ASH$
- (3)  $CH_3COCH_2COSCoA + NADPH_2 \xrightarrow{\text{レダクターゼ}} CH_3CHOHCH_2COSCoA + NADP$
- (4)  $CH_3CHOHCH_2COSCoA + (-CH(CH_3)CH_2CO)_n \xrightarrow{\text{ポリマーゼ}} (-OCH(CH_3)CH_2CO)_n + C\bullet ASH$

ここで  $(-OCH(CH_3)CH_2CO)_n$  は  $(n-1)$  個の繰返し単位を含むPHBである。したがつて、反応(4)は、 $-OCH(CH_3)CH_2CO$  単位を直合体鎖に附加する。

この発明により、ある種の有機酸の存在下に、一定条件下で微生物を培養することにより、直合体鎖に少割合の共单量体単位を導入できることが

判明した。プラスチック材料として実用的用途のためには、重量平均分子量( $M_w$ )1,000以上（例えばゲル透過クロマトグラフィで測定）でなければならない。

したがつて、この発明により重量平均分子量1,000以上で繰返し単位



9.9.9ないし5.0モル%および繰返し単位

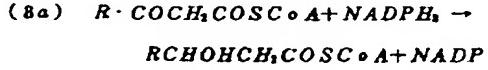


0.1ないし5.0モル%を有する共重合体を提供する。

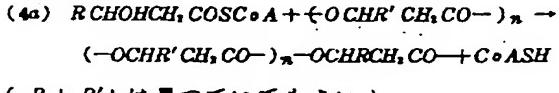
(式中 $n$ は0または1、 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ および $R^4$ はそれぞれ炭化水素基、例えばアルキル基、アラルキル基、アリール基またはアルカリール基、ハロ-およびヒドロキシ-置換炭化水素基、ヒドロキシ基、ヘロゲン原子および水素原子から選択する、ただし $n=1$ 、 $R'$ 、 $R''$ および $R'''$ がそれぞれ水素原子のとき、 $R^4$ はメチル基ではない)。

基 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ および $R^4$ は、それぞれ4個以下の炭素原子を含むものが好ましい。一般に、基

変性したのと/orして一般式 $RCOCH_2COSC\cdot A$ の脂肪族アシルチオエステルを還元する：

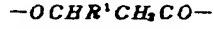


反応(4)のポリメラーゼ酵素は、絶対等異性ではない。一般的反応は、次のように示される：



( $R$ と $R'$ とは異ついててもよい)

したがつて、このルートは、次の単位を含む重合体になる：



即ち単位 $-OCR'R'CR'R'CO-$

( $R'$ 、 $R''$ および $R^4$ はそれぞれ水素原子)

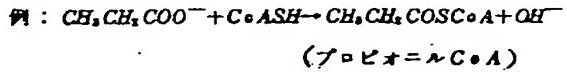
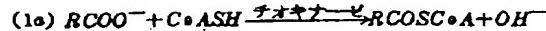
もし、若干の繰返し単位中、 $R'$ がメチルでなければ、共重合体が得られる。

反応(4a)の反応体である $\alpha$ -ヒドロキシチオエステル、例えば $RCHOHCH_2COSC\cdot A$ は、場合により、非等異性脂肪酸代謝酵素エノイルヒドロターゼにより触媒される反応によつても製造され

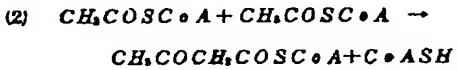
$R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ および $R^4$ の少なくとも1個は、水素原子である。

用いる各酵素はある程度の非等異性を有しているので、このよう共重合体が製造できる。

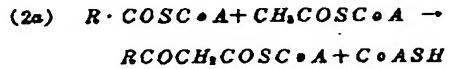
反応(1)に関する酵素チオキナーゼは、広範な等異性を有し、チオキナーゼは次の反応により、補酵素Aを種々の他のカルボキシ基に結合させる：



酵素 $\beta$ -ケトチオラーゼが関与する反応(2)は、次のように示される：

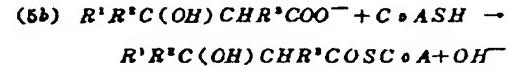
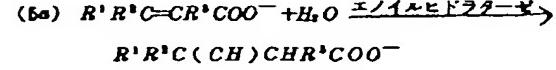


この反応は一部等異性的で、一方の反応体はアセナルCoAでなければならない。したがつて、一般的な反応は、次の通りである：



同様に、反応(8)のレダクターゼ酵素の等異性は、

る：



(反応(5a)、(5b)は、逆にすることもできる。即ち炭素-炭素二重結合の水素化は、チオエステル化反応の後に起きてもよい)。 $R'$ 、 $R''$ および $R'''$ は、必ずしも水素原子でなくてもよい。

したがつて、反応(5a)、(5b)および(4a)を用いて、次の単位を重合体鎖に導入することもできる：

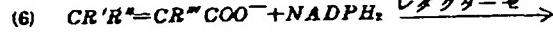


即ち、単位 $-OCR'R^3CR^3R^4O-$  ( $R^4=H$ )。したがつて、もし $R'$ および $R^3$ がそれぞれ水素原子でなく、繰返し単位 $R'$ の若干がメチル基でなければ、共重合体が得られる。

反応(4a)のポリメラーゼ酵素も非等異性であつて、 $\alpha$ -位置にヒドロキシ基を有する反応体、例えば次のタイプのもの

でなければ、共重合体が得られる。

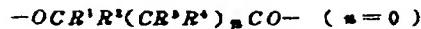
不飽和酸では、反応(5a)の代りに反応(5b)が起き、重合体合成は反応(2a)および(8a)を含むルートの外に、例えば反応(5a)による炭素-炭素二重結合の水素化または炭素-炭素二重結合の還元により進行し、例えば次の反応による：



したがつて、一つの可能な順序は、次の通りである：



即ち単位

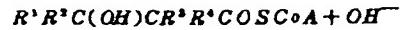


を重合体鎖に導入する。

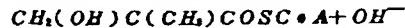
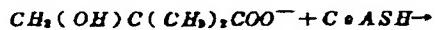
場合によつては、このポリメラーゼ酵素は、次の一式の $\alpha$ -ヒドロキシ反応体も変化する：



これらの反応体は、反応(1b)により対応する $\alpha$ -ヒドロキシ酸から作られる：



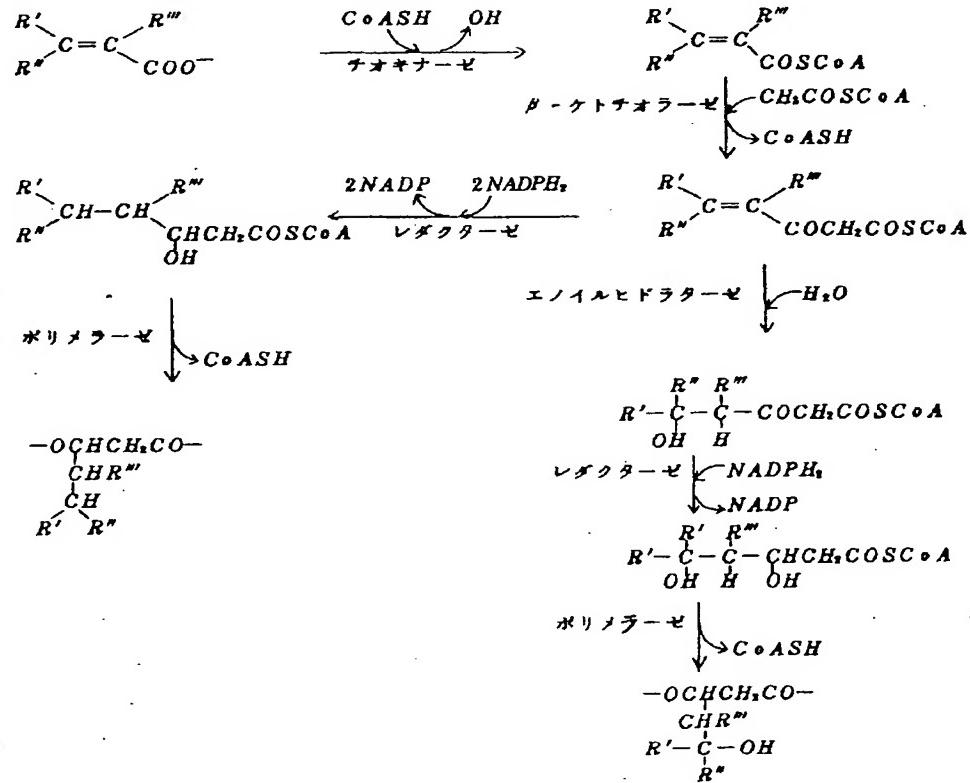
例えば、 $\alpha$ -ヒドロキシ酸は $\alpha$ -ヒドロキシブチリル CoA を与え、ビバリン酸はビバリル CoA を与える：



このような反応体は、次の式の単位



を重合体に導入し、 $R^1$ 、 $R^2$  および  $R^4$  がそれぞれ水素原子で、繰返し単位  $R^3$  の若干がメチル基



したがつて、これらのルートは、次の単位を含む共重合体を与える：



即ち



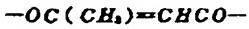
この場合  $R^1, R^2$  および  $R^4$  は、それぞれ水素原子で、 $R^3$  は

$-CHR''CHR' R''$  および / または  $-CHR''C(OH)R' R''$  である。

共重合体中の譲返し単位Ⅱの割合は、共重合体の全譲返し単位の 0.1 ないし 50 モル%、特に 1 ないし 40 モル%である。場合によつては、微生物により得られる重合体は、譲返し単位ⅠおよびⅡを含む共重合体との混合物である。この場合、重合体中の譲返し単位Ⅱの全体の割合は、全譲返し単位の 0.1 ないし 50 モル%である。好ましくは、譲返し単位Ⅱの割合は、8 ないし 30 モル%である。

この発明により、上記の反応のコースに従う代りに、微生物は、上記の反応に加えてまたはその若干の代りに脱離反応を行い、8-位置のヒドロ

いる。Davis によれば、 $\alpha$ -ヒドロキシ酸単位および次の 8-ヒドロキシ-2-ブテン酸単位



を含む共重合体であるとされているこれら重合体は、Nocardia をエーテルに培養して製造できる。

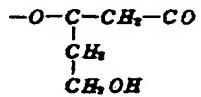
Wallen 外は Environmental Science and Technology 6 (1972) p. 161~164 および 8 (1974) p. 576~579 K、活性汚泥から単離し反復洗浄後融点 97~100°C で、 $\alpha$ -ヒドロキシ酸単位および次の  $\alpha$ -ヒドロキシピベリン酸単位



を 1 : 5 の比で含む重合体を発表している。

Marchessault 外は、IUPAC Macro Polymers 1980 International Symposium on Macromolecules Preprints 2 (1980) p. 272~275 K、この化合物の研究を報告し、主として  $\alpha$ -ヒドロキシペレリン酸単位を含むことを確認している。

キシ基を介して直合体鎖に結合した  $\alpha$ -ヒドロキシペレリン酸単位および / または次の 8-ヒドロキシドロキシベンタノン酸単位



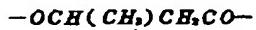
を含む重合体を与える。したがつて、共重合体は、次の単位を含んでいる：



(式中  $R^1$  は、エチル基または 2-ヒドロキシエチル基)。

$n = 1, R^1$  がエチル基、 $R^2, R^3$  および  $R^4$  がそれぞれ水素原子の共重合体が好ましい。

$\alpha$ -ヒドロキシ酸単位即ち次の単位



および他の単位を含むある種の重合体は、既に文献に記載されている。

エチレン性不飽和を示す赤外バンドを示す重合体が、Davis により Applied Microbiology 12 (1964) p. 801~804 に発表されて

U.S.P. 3,275,610 には、ある種の微生物、特に Nocardia salmonicolor を炭素数 4 個を含むカルボン酸に培養するポリエステルの微生物学的製造法が示されている。実施例 2 および 8 では、それぞれ 8-ブテン酸および  $\alpha$ -ヒドロキシ酸を用い、重合体は示された融点の 178~184°C のオーダーからより  $\alpha$ -ヒドロキシ酸である。しかし、実施例 1 では、2-メチルアクリル酸(メタクリル酸)を用い、得られる重合体は同定していないが、融点 215~220°C を有しかつメチルエチルケトンに可溶性と説明されている。これに対し、この発明の主とし  $\alpha$ -ヒドロキシ酸残基を含む共重合体は、融点 180°C 以下で冷メチルエチルケトンに不溶性である。

PHB 著生性微生物を、適当な基質、即ちエチルヤードおよび炭素源に好気的に培養すると、微生物は増殖のための必須要件の一つまたはそれ以上が消費されるまで増殖する。以下においてこの微生物の増殖を、"繁殖" と称する。繁殖必須要件の一つが消費されたとき、その後の繁殖は、もし

あつたとしても極めて限られた程度であるが、基質は消費されず、PHBは微生物に蓄積される。

ある種の微生物では、PHB 脱発抑制因子、例えば 1 つまたはそれ以上の繁殖必須要件の制限が存在しなくとも、微生物の繁殖中に PHB は蓄積するであろう；しかし、このように蓄積した PHB の量は一般に少量で、代表的には得られる細胞の約 1.0 wt% 以下である。したがつて、バッチ式培養で繁殖したとき、1 つまたはそれ以上の繁殖必須要件が消費されるまでは、殆んど PHB 蓄積なしで微生物は繁殖し、その後微生物は PHB を合成する。

この発明により、共重合体を製造するために、繁殖のための必須要件の 1 つまたはそれ以上の量を制限するが、PHB 蓄積は制限しない条件下での微生物の培養中、基質の少なくとも一部として一般に共単量体単位になる酸を用いる必要があることが判明した。繁殖の必須要件の制限を行わないときは、一般に酸は微生物により別の経過で代謝され、例えばアセチル CoA または TCA サイク

たような量である。

基質および酸素（これは一般に酵解器の水性培地に空気を注入して供給される）に加えて、各種の栄養塩類が微生物が繁殖するために必要である。したがつて、一般に同化できる形態の次の元素源（普通は水溶性塩）が必要である：窒素、リン、イオウ、カリ、ナトリウム、マグネシウム、カルシウムおよび鉄とともに微量元素、例えばマンガン、亜鉛および銅。酸素の酵解器への供給を制限してポリエステル蓄積を誘導することも可能であるが、1 つまたはそれ以上の栄養塩の量を制限するのが好ましい。制限するのに最も実用的な元素は、窒素、リンであり、好ましくないのはマグネシウム、イオウまたはカリである。これらの中でも、窒素（これはアンモニウム塩で供給するのが便利である）の量を制限するのが最も好ましい。必要とする同化性窒素の量は、ポリエステル蓄積の少ない細胞の所望重量の約 8～15% である。

酵解は、水性培地 1 L 当りポリエステル含有細

ルの一員になり、共重合体は製造されなくなる。したがつて、一例として、何らの繁殖制限をしてはプロピオン酸は微生物により代謝され、プロピオニル CoA を経て炭酸ガスを取り込みメチルマロニル CoA、次いで TCA サイクルの一員であるサクシネートになる。

したがつて、この発明により、ポリエステルを蓄積できる微生物を、水溶性、同化性炭素含有基質の水性培地で、培養の少なくとも一部は微生物繁殖の 1 つまたはそれ以上の必須要件を制限するがポリエステル蓄積は制限しない条件下で培養を実施して、熱可塑性ポリエステルを製造する方法において、培養を制限した期間の少なくとも一部の間で、基質がこの制限された条件下で微生物により、 $-OCH(CH_3)CH_2CO-$  繰返し単位のみよりも以外のポリエステルに代謝できる有機酸またはその塩よりなることを特徴とする方法を提供する。

この点に関し、前記の U.S.P. 8275610 では得られる細胞の量は、繁殖制限が行われなかつ

るの乾燥重量が少なくとも 5% になるように行なうのが好ましい。したがつて、もし例え PHB 含有量 4.0 wt% の PHB 含有細胞を 1.0 g/L で作ろうとすれば、細胞繁殖量制限に用いるのに酵解器に供給する必須栄養の量は、PHB を含まない細胞 6 g/L の繁殖を支持するのに要する量である；したがつて、もし窒素を繁殖制限栄養として用いれば、PHB を含まない細胞の窒素含有量は約 8～15% であるから、必要な同化性窒素の量は約 0.5～0.9 g/L であり、例えばアンモニアイオン 0.6～1.2 g/L である。

酵解は、例えば pH、温度および曝気の程度（酸素を制限栄養源としないとき）を微生物に対し常用する条件下で行なう。同様に、用いる栄養塩類（その使用量は上記の条件を考慮して決定した、繁殖制限栄養源以外）は、微生物の繁殖に通常用いる量である。

微生物は、容易に代謝できる基質、例えば炭水化合物に対し、重合体蓄積段階で制限すべき繁殖用に必要な充分の栄養源の存在下に、培養により所

量の重複まで繁殖させるのが好ましい。場合により、繁殖段階の少なくとも一部、また場合によつては全部に対する基質は、重合体蓄積段階で繰返し単位Ⅱになる酸である。

酸は、繁殖には必要であるが重合体蓄積には必要でない栄養源の量が消耗したときに、重合体蓄積が起こるバッチ式酵解で行われる。別法として、酸は、新鮮な水性培地および基質の添加速度に対応する速度で、酵母容器からバクテリア細胞を含む水性培地を連続的または間欠的に除去する連続式酵解で行う。酵母容器に供給する制限した栄養源の量は、容器から除去した水性培地がこの栄養源を殆んど含まぬような量で、容器から除去した水性培地を、次いでバッチ式または好ましくは連続式で換葉する第2酵母容器に供給し、共重合体生産性酸を含む新鮮な基質の添加で、通気培養を継続して重合体蓄積を起こさせる。この追加酵解工程で、追加量の基質および栄養塩類を添加するが、追加繁殖は一般に好ましくないので、制限繁殖に用いる栄養源は加えるべきではない。

のみを与える基質が、唯一の基質である。

場合によつては、この経路に必要な酵素をプロトクルすることおよび/または必要な酵素合成の能力のない微生物を用いることにより、酸のアセナル CoAへの通常の代謝を阻止することも可能である。しかし、実質的収量の重合体を得るために、繁殖に要する栄養を制限し、好ましくは消耗した条件下での一定期間の培養が、一般に好ましい。

酵解は、蓄積したポリエステルの量が、バクテリア細胞の約 50 ~ 80 wt% になるように行うのが好ましい。

共重合体を得るために用いられる酸は、培養が繁殖制限状態であるとき、繰返し単位Ⅰのみにならないものである。したがつて、不適当な酸には酢酸およびダ-ヒドロキシ酪酸、TCAサイクルのメンバー、および培養が繁殖制限状態になるときアセナル CoAのみを与える酸および/またはTCAサイクルのメンバーである。したがつて、不適当な酸には、ホスホグリセリン酸、ビルビン酸、クエン酸、イソクエン酸、ロ-ケトグルタル酸、コ

しかし、第1酵母器から別の1個またはそれ以上の酵母器に供給した水性培地に、前段栄養源が若干の残存量を含むことおよび/またはその少量を添加することが、効果的な操業に好ましい。

上記のバッチ式または連続式の何れの場合も、共重合体繰返し単位Ⅱを与えるのに用い酸は、繁殖に必要な栄養が消耗したときに起きた、重合体蓄積段階中の基質の一部または全部として用いる。この酸は、反復単位Ⅰを与える基質、例えば炭水物との混合物で用いるか、または唯一の基質が用いられる；後者の場合、十分な酸が、アセナル CoAへの別の経路で代謝されて繰返し単位Ⅰを与え。もし別の経路が反応(2a)を含めば、繰返し単位Ⅱを得るために必要な任意のアセナル CoAが用いられる。しかし、酸が唯一の基質であれば、重合体収量は往々にして低下する。

繰返し単位Ⅱを与える酸は、重合体蓄積段階の一部のみに存在させることもできる；酸が存在する重合体蓄積段階の部分の前および/または後に起きた、重合体蓄積段階の残りでは、繰返し単位Ⅰ

ハク酸、マル酸、マレイン酸、リンゴ酸、オキサル酢酸、オキサロコハク酸、アコニット酸およびメチルマロン酸がある。アミノ酸も、同様に不適当である。ダ-酸化によつてダ-ヒドロキシ酪酸になる酪酸も、同じく不適当である。酵素ナオキナーゼは補酵素 A をや酸エステルに附加しないので、や酸は共重合体を与えない。

適当な酸は、プロピオン酸、イソ酪酸、これらおよび酪酸のヘロまたはヒドロキシ置換誘導体、例えば3-クロロプロピオン酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、4-ヒドロキシ酪酸(ダ-ヒドロキシ酪酸は不適当)、ビバリン酸、ヘロ酢酸、フェニル酢酸および安息香酸、およびこれらの不適和酸またはヘロ置換誘導体、例えばアクリル酸、メタクリル酸(2-メチルアクリル酸)、8,8-ジメチルアクリル酸、2,3-ジメチルアクリル酸、8-クロロプロピオン酸および2-クロロプロピオン酸である。

基質は水溶性でなければならず、酸は水溶性であればそのまま、または水溶性塩例えばアルカリ

金属塩で感知する。上記の通り、場合によつては、微生物はさらに酸との反応を行うこともある。したがつて、イソ酪酸は $\alpha = 1$ 、 $R^1=R^2=R^4=H$ 、 $R=$ イソプロピル基の繰返し単位IIを与える。 $\alpha = 1$ 、 $R^1=R^2=R^4=H$ 、 $R^3=$ エチル基の繰返し単位IIがあり、微生物が共重合体への代謝経路中で、メチル基を水素で置換することを示している。

種々の酸に対する、繰返し単位IIの $\alpha$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ および $R^4$ は次の通りである。

酸	$R^1$	$R^2$	$R^3$	$R^4$	$\alpha$
プロピオン酸	エチル*	H	H	H	1
イソ酪酸	イソプロピル*	H	H	H	1
3-クロロプロピオン酸	2-クロロエチル***	H	H	H	1
3-ヒドロキシプロピオン酸	水素または2-ヒドロキシエチル	H	H	H	1
アクリル酸	水素または2-ヒドロキシエチル**	H	H	H	1
3・8-ジメチルアクリル酸	メチルまたは2-メチルプロピル*または2-ヒドロキシ-	H	H	H	1
	2-メチルプロピル	H	H	H	1
2・8-ジメチルアクリル酸	メチルまたは1-メチル-2-ヒドロキシプロピルまたは1-メチルプロピル*	H	H	H	1
	水素またはイソプロピル*または1-メチル-2-ヒドロキシエチル	H	H	H	1
2-メチルアクリル酸	水素またはイソプロピル*または1-メチル-2-ヒドロキシエチル	H	メチル	H	1
3-クロロプロピオン酸	Cl または2-クロロエチルまたは2-クロロ-2-ヒドロキシエチル	H	H	H	1

置	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	n
2-クロロプロピオニ酸	水素または1-クロロエチル または1-クロロ-2-ヒド ロキシエチル	H H	Cl H	H H	1 1
クロロ酢酸	クロロメチル***	H	H	H	1
2-ヒドロキシ酢酸	エチル	H	-	-	0
ビバリン酸	水素	H	メチル	メチル	1

注:

- エチル存在
- 2-ヒドロキシエチル存在
- \*\*\* エチルおよび2-ヒドロキシエチル存在
- \*\*\*\* メチル存在

使用できる微生物は、共重合体を製造しようとする酸またはその塩を同化できる任意のポリタ-ヒドロキシ酸基性微生物である。バクテリア *Alcaligenes eutrophus* (従来は *Hydrogenomonas eutrophus* として知られていた) 種、例えばこの種の学術的研究に広く用いられた H 16 株、(ATCC M17699, *J General Microbiology* (1979) 115, p. 185~192 参照) および H 16 株の変異株、例えば 11/7B, S 801/C5, S 501/C29 および S 501/C41 (それぞれ the National Collection of Industrial Bacteria, Terry Research Station, Aberdeen, Scotland U.K. 1980 年 8 月 18 日に寄託した、NCIBM11600, 11698, 11697 および 11698) が特に適している。ATCC 號は、the American Type Culture Collection, 12801 Park Lane Drive, Rockville, Maryland 20852 U.S.A. で与えられた番号である。上記の通り、繁殖段階中、炭水化物を基質として用いるのが好

ましい。*Alcaligenes eutrophus* H 16 株 (ATCC M17699) は、グルコースを変化しないが、その変異株例えば上記の 11/7B, S 801/C5, S 501/C29 および S 501/C41 は、グルコースを変化できる。炭水化物、特にグルコースは、コストの面および微生物が効果的に繁殖できるので、繁殖段階での好ましい基質である。

ポリエステルは、微生物細胞内部の顆粒として製造される。ポリエステルを含有する細胞は、例えば USP 3107172 に示すように、そのまままで成形材料として用いられるが、一般にポリエステルを、バクテリア細胞から分離するのが好ましい。これは、細胞を細胞崩壊、次いで適当な溶剤でポリエステルを抽出することで達成される。適当な抽出処理の例は、ヨーロッパ特許出願第 15128 号に記載されている。

上記の通り、直合体が実用できるためには、グルコースタロマトグラフィーで測定した直合平均分子量 ( $M_w$ ) 10,000 以上でなければならない。

好ましくは、 $M_w$  は 50000 以上、より好ましくは 100000 以上、特に 200000 以上である。

共重合体は、常に D-立体配位を有し、ターヒドロキシ脂肪酸モヌ合体よりも低い融点を示す。

共重合体は、溶融成形品の製造に特に有用であり、この場合ターヒドロキシ脂肪酸モヌ合体<sup>※</sup>で匹敵する還元結晶化度が好ましい。

特に興味深いのは、少量の共重合体<sup>※</sup>塩化ビニル系重合体の高分子量加工助剤としての用途である。この応用では、共重合体の量は、塩化ビニル重合体に対し 0.5 ~ 1.0%<sup>w/w</sup> である。最も良い結果を得るには、共重合体はランダムでなければならない。ランダム共重合体を得るには、共単體単位<sup>II</sup>を得るために用いる際は、少なくとも繁殖要件制限条件下での微生物の培養期間を通じて唯一の基質として存在するのが好ましい。

共重合体は、溶融押出し後、好ましくは重合体のガラス転移点 ( $T_g$ ) と融点との間の温度で、一対またはそれ以上のロールを通して、フィル

グルコースを含む水性培地 A を用いるバッチ式醸酵器で、通気培養により繁殖させた。水性培地 A は、脱イオン水 1 L 当り次の組成を有していた。

$(NH_4)_2SO_4$	2 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.8 g
$K_2SO_4$	0.45 g
$H_3PO_4 (1.1M)$	1.2 mL
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1.6 mg

微量元素溶液は、脱イオン水 1 L 当り次の組成を有していた。

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.02 g
$ZnSO_4 \cdot 6H_2O$	0.1 g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.1 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2.6 g

生体濃度が 4.5 g / L に達したとき、即ち糞の同化性窒素が枯渇した後、 $1 - ^{14}C$ -プロピオネートを含むプロピオン酸ソーダ 1 g / L をグルコースとともに醸酵器に加え、醸酵を 5 分間継続した。次いで、細胞を浮遊により回収し、重合体を

ムの厚さを減少しつつ若干の分子配向を導入するフィルムの製造にも用いられる。

この発明を、以下の実施例で説明する。

### 実施例 1

プロピオネートの通常の代謝では、プロピオネートはサクシネートに変換し、これは TCA サイクルのオキサロ酢酸への酸化、次いで脱カルボキシル化によりアセチル CoA となる。オキサロ酢酸の脱カルボキシル化では、両方の末端基は炭酸ガスとして除去される。したがって、もしカルボキシ基に放射性ラベルした炭素原子を有するプロピオネート、即ち  $1 - ^{14}C$ -プロピオネートを、アセチル CoA への細胞変換に供給すれば、 $^{14}CO_2$  として放射能は失われる。重合体への何らかの  $^{14}C$  の組込みは、プロピオニル CoA のターヒドロキシパレリル CoA への変換、引き続く重合からもたらされる。

#### *Alcaligenes eutrophus* 变異株 NCIB

11598 を、8.5 g / L の蓄積ポリエステルを支持するに充分な同化性窒素および基質としての

クロロホルムで抽出した。ラベルした炭素は、殆んど完全にクロロホルム溶液にあり、ラベルした末端炭素原子が炭酸ガスとして損失しなかつたことを示した。したがって、少なくとも幾らかのプロピオネートは、アセチル CoA として以外に重合体に組み込まれた。

### 実施例 2 (比較例)

#### *Alcaligenes eutrophus* 变異株 NCIB

11598 を、脱イオン水 1 L 当り次の組成を有する水性培地 B 4000 mL を含む 5 L バッチ式醸酵器で、pH 6.8、34°C で通気培養により繁殖させた。

$(NH_4)_2SO_4$	4 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.8 g
$K_2SO_4$	0.45 g
$H_3PO_4 (1.1M)$	1.2 mL
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1.6 mg

実施例 1 で用いた  
微量元素溶液

グルコースを、8 g / hr の割合で醸酵器に供給

した。培地Bの同化性蛋白の量は、26.8gのPHBを含む細胞を支持するに充分であつた。

40時間後、細胞を遠心分離で回収した。細胞を凍結乾燥し、直合体をクロロホルムで抽出した。

#### 実施例8

実施例2を繰返したが、細胞重量8.4gに達したとき、グルコースの代りにプロピオン酸を2.8g/hrの割合で酵解器に供給した。

#### 実施例9

実施例8を繰返したが、プロピオン酸の供給は細胞重量8.8gに達したときに開始した。

#### 実施例10

実施例8を繰返したが、プロピオン酸の供給は、細胞重量5.6gに達したときに始めた。

#### 実施例11

実施例8を繰返したが、細胞重量4.8gに達したとき、プロピオン酸1.2gを一度に添加した。

#### 実施例12

実施例2を繰返したが、培地Aを用い、グルコースの代りにプロピオン酸を4g/hrの割合で、

(辺り糸の蛋白が枯渢したとき)に酵解器に供給したグルコースの量とより酵解器に供給した酸の量の合計の比が、第1表に示す値に達するまで、酵解を継続した。

#### 実施例13

実施例2を繰返したが、細胞重量が26.4gに達したとき、グルコースの代りに8-クロロプロピオン酸を4g/hrの割合で5時間酵解器に供給した。

#### 実施例14

実施例11を繰返したが、8-クロロプロピオン酸の供給は、細胞重量84.4gに達したときに開始した。

#### 実施例15

実施例12を繰返したが、細胞重量80gに達したとき、8-クロロプロピオン酸4gを一度に添加し、次いでグルコースを6.8g/hrの割合で7時間供給した。

実施例11～15では、8-クロロプロピオン酸は、50g/lを含む溶液で添加した。

酵解中を全体を通じて供給した。

#### 実施例8

実施例2を繰返したが、細胞重量が8.8gになつたとき、グルコースの代りに、グルコース5.2g/hr、プロピオン酸2.8g/hrの割合で、グルコースおよびプロピオン酸の混合物を酵解器に供給した。

#### 実施例9

実施例8を繰返したが、細胞重量28gに達したとき、グルコース6.8g/hrおよびプロピオン酸1.2g/hrの割合で、混合物の供給を開始した。

実施例2～9では、プロピオン酸は400g/lを含む溶液として添加した。

#### 実施例10

実施例2を繰返したが、細胞重量が28gに達したとき、グルコースの代りにインスルリンを酵解器に2g/hrの割合で供給した。インスルリンは、150g/lを含む溶液で添加した。

実施例3～6および8～10では、酵解器に供給した酸の重量対細胞重量が28gに達した後

#### 実施例14

実施例2を繰返したが、細胞重量81gになつたとき、グルコースの代りにアクリル酸を4g/hrの割合で5時間酵解器に供給した。アクリル酸は、100g/lを含む溶液で添加した。

第 1 表

実施例	膜	膜供給比 <sup>*</sup> (%)	最終細胞濃度 (g/L)	細胞中の重合体の量 (wt%)
2	なし	0	20.0	70
8	プロピオン酸	7.5	15.6	70
4	プロピオン酸	6.0	18.3	60
5	同上	8.8	16.0	70
6	プロピオン酸	4	13.0	68
7	同上	10.0	6.4	55
8	プロピオン酸	1.7	18.6	55
9	同上	9.5	14.2	67
10	イソ酪酸	6.6	18.0	50
11	8-クロロプロピオン酸	6.1	7.4	25
12	8-クロロプロピオン酸	8.8	4.5	20
13	同上	6.5	9.8	35
14	アクリル酸	5.0	6.0	25

注・ 膜供給比は、酵母器に供給した膜の重量を、細胞乾燥重量 26 g に通じた後に添加したグルコースの重量および酵母器に供給した膜の重量の合計で除した商である。

実施例 2 ~ 14 の重合体中の共単量体単位の量は、(a) 加水分解およびガスクロマトグラフィおよび(b)<sup>13</sup>C 核磁気共鳴スペクトロスコープにより決定した。

重合体の分子量は、ゲル透過クロマトグラフィで決定した。

塩素分析も、実施例 2、11、12 および 13 の重合体について行つた。

結果を第 2 表に示した。

8-クロロプロピオン酸からの塩素は、殆んど重合体に見出されなかつた。したがつて、8-クロロプロピオン酸の代謝中に HCl が失われて、得られる炭素 - 炭素二重結合は、水素化および水和されて、予期された 2-クロロエチル基の代りに、R' としてエチルおよび 2-ヒドロキシエチル置換基になつた。しかし、実施例 11 ~ 13 の重合体の塩素含有量は、若干の塩素が 2-クロロエチル基として存在することを示している。

第 2 表

実施例	膜	$R_1$	単位Ⅱのモル量		分子量		塩素 (ppm)
			NMR による	加水分解およびガスク ロマトグラフィによる	$M_w \times 10^{-4}$	$M_w/M_n$	
2	なし	—	0	0	292	2.75	40
3	プロピオン酸	エチル	27	33	207	6.23	
4	プロピオン酸	エチル	24	27	874	1.89	
5	同上	エチル	18	14	258	8.50	
6	プロピオン酸	エチル	6	8	848	1.66	
7	同上	エチル	25	26	886	1.70	
8	プロピオン酸	エチル	15	14	889	1.67	
9	同上	エチル	6	7	248	2.56	
10	イソ酪酸	エチル	80	29	274	2.88	
11	8-クロロプロピオン酸	エチル 2-ヒドロキシエチル	7 1.8	— —	888	2.99	475
12	8-クロロプロピオン酸	エチル 2-ヒドロキシエチル	4 1.2	— —	876	1.77	265
13	8-クロロプロピオン酸	エチル 2-ヒドロキシエチル	2 0.6	— —	811	1.89	45
14	アクリル酸	2-ヒドロキシエチル	6.5	—	858	2.86	

局分解能  $^{13}C$  NMR を用いて、実施例 8～10 の共重合体の単量体序列を調べた。カルボニル基の炭素原子から得られるシグナルは、その環境に応じて、異なる化学シフトで起きることが判明した。したがつて、単位 I やおよび II ( $n=1$ ,  $R^1=C_2H_5$ ,  $R^2=R^3=H$ ) を含む重合体では、可能な序列は次の通りである。

#### A. プチレート-ブチレート



#### B. ベンタノエート-ベンタノエート



#### C. ブチレート-ベンタノエート



実施例 2～10 の重合体の NMR 検査は、それぞれ 169.07, 169.25 やおよび 169.44 ppm で起きる 8 個の共鳴を示した。M. Iida 外 (Macromol. 11 (1978) p 490) によれ

ば、169.07 ppm での共鳴は、ブチレート-ブチレートの序列 A であり、169.44 ppm はベンタノエート-ベンタノエートの序列 B である。推論によれば、169.25 ppm でのシグナルは、ブチレート-ベンタノエートの序列 C から生じる。

実施例 10 の重合体の NMR の結果の定量的分析は、次の結果を与えた。

序列 A (ブチレート-ブチレート) 55%

序列 B (ベンタノエート-ベンタノエート) 14%

序列 C (ブチレート-ベンタノエート) 81%

これらの結果は、実施例 10 の重合体が単位 I やおよび II ( $n=1$ ,  $R^1=C_2H_5$ ,  $R^2=R^3=R^4=H$ ) の共重合体を実質的量で含むことを、明らかに示している。しかし、繰返し単位 I のホモ重合体の若干も存在する可能性がある。

実施例 2～14 の重合体は、全部 D (-) 立体配置を有していた。

抽出したままの共重合体の熱的挙動は、コンピューターデーター分析付のジユポン 1090 システムを用いて、先ず差動熱計量法 (DSC) で決

定した。DSCを、180°Cで圧縮成形し、完全に結晶化した製品を得るために、プレス中に冷却した後の試料でも実施した。それぞれの場合、見本は空気中で20°C/分で加熱し、スタート( $T_s$ )および吸熱浴槽のピーク( $T_p$ )の温度をその面積とともに記録した。アニーリングした試料の加熱を200°Cまで延長し、完全に溶融させるため1分間等温にした後、試料を液体窒素中で急冷した。非晶領域のガラス転移温度( $T_g$ )を決定するために、DSCを再び行つた。最後に、密度勾配浮遊法により、アニーリングした共重合体の密度を測定した。

結果を、第8表に示した。

第 8 表

実験例	抽出重合体のDSC			アニーリングした重合体のDSC				密度 (g/cm <sup>3</sup> )
	$T_s$ °C	$T_p$ °C	面積(J/g)	$T_g$ °C	$T_s$ °C	$T_p$ °C	面積(J/g)	
2	140	188	100	5.9	140	191	127	1.256
3	120	125 166	5 20	-1.9	140	171	18	1.172
4	120	170	50	0.8	140	182	44	1.174
5	110	120 170	5 50	2.2	140	177	45	1.200
6	120	172	100	2.7	120	178	96	1.225
7	80	132	84	0.4	80	132	40	1.198
8	110	120 166	6 60	2.0	140	174	43	1.199
9	110	156	89	4.0	110	168	81	1.210
10	50	65 120 168	10 3 25	-2.0	130	172	26	1.188
11	110	170	67	5.0	120	180	78	-
12	110	177	86	4.1	120	178	86	1.182
13	100	172	98	5.9	120	171	96	1.218
14	110	172	84	2.7	110	174	75	1.212

共重合体の広い融点範囲は、共重合体がむしろ不均質組成物であることを示している。しかし、溶融加熱がよりシャープになりかつ面積が僅かに減少しているので、アニーリングしたとき、エステル交換による顕著なランダム化が起きている。このことは、重合体はホモ重合体の物理的混合物でなく、実の共重合体の指標である。

多くのDSCピークが、実施例3、5、8および10の抽出したままの重合体で観察された。

溶融吸熱面積は、結晶化度の指標である。アニーリング後の実施例3～14の重合体は、全部実施例2の対照ホモ重合体よりも、著るしく結晶化度は低かつた。

#### 実施例 15

*Alcaligenes eutrophus*変異株 NCIB 11599を、水性培地C（これは培地Bと同じであるが、PHBを含まぬ細胞8.5 g/lを支持するのに充分な硫酸アンモニウム2.2 g/lであつた）400 mlを含む50パツチ式醸酵器で、pH 6.8、84℃で通気培養により繁殖させた。

合体約0.7 g、ホモ重合体0.04 g以下が溶解した。

これに対し、Wallen 外により *Environmental Science and Technology* 8(1974) p. 578～579に記載の重合体は、無エタノールに可溶性とされている。

#### 実施例 16

水性培地D、EおよびFを、脱イオン水1 l当たり次の組成で作つた。

##### 培地 D

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.2 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.2 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.5 g
CaCl <sub>2</sub>	0.12 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.006 g
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.006 g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.0015 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (濃厚)	1 ml

##### 培地 E

基質は、5.5 g/l/krの割合で供給するグルコースであつた。細胞濃度が7 g/lに達したとき、グルコースに加えてプロピオニ酸を1.5 g/l/krの割合で供給した。細胞乾燥重量が15 g/lに達したとき、細胞を回収した。細胞懸濁液を噴霧乾燥し、脂質を乾燥細胞のメタノール還流で抽出し、重合体をクロロホルム還流で抽出した。クロロホルム溶液をメタノール/水混和物に添加する沈殿法により、重合体を回収した。

共重合体は、反応単位II ( $R=C_6H_5$ ,  $R^1=R^2=H$ ,  $n=1$ ) 2.0モル%を含んでいた。共重合体は、分子量850,000を有し、冷メチルエチルケトンに不溶性であつた。共重合体2 gを、メチルエチルケトン100 mlで1時間還流すると、全量溶解した。溶液を冷却すると、ゲル状マスを生じた。これに対し、ターヒドロキシ酪酸のホモ重合体2 gをメチルエチルケトン100 mlと還流したとき、溶解したホモ重合体は0.1 g以下であつた。メチルエチルケトンの代りにエタノールで、溶解度テストを反復すると、1時間還流後、共重

H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1.1M)	2.4 ml
グルコース	4.0 g

##### 培地 F

H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1.1M)	2.4 ml
プロピオニ酸	4.0 g

消毒した公称容量250 mlパツチ式醸酵器に、培地DおよびEのほぼ等容量混合物を、180 mlのマークまで満たした。醸酵器中の培地の少量の試料で、窒素含有量を分析した。次いで、培養器に *Alcaligenes eutrophus*変異株NCIB 11599を播種し、醸酵を84℃で、苛性ソーダ溶液の添加でpH 6.8に自動的にコントロールして好気的に行つた。

醸酵器に存在した同化性窒素の量は、PHBを含まぬ細胞約1.2 kgのみまでの微生物繁殖を行つて充分であつた。細胞重量が約1.05 kgに達したとき、培地Eの供給を、6.5 l/krの割合で開始した。

細胞重量が約1.700 gに達したとき、培地Eの供給を停止し、培地Fの供給を6.5 l/krの割

合で開始し、細胞約2.6kgが製造されるまで酵母を継続した。

次いで、細胞懸濁液を、遠心分離により濃度約60%／&まで濃縮し、懸濁液1容量を1.2-ジクロロエタン(DCE)2容量とシルバーソンミキサーで20℃で15分間接触させて重合体を抽出した。~~DCE~~相を、細胞の残骸を含む水性相から分離し、沪過した。沪過したDCE相1容量を、メタノール／水(4/1、容量)混合物4容量に加えて、重合体を沈澱させた。沈澱重合体を沪別し、メタノールで洗浄してから、オーブンで100℃で4時間乾燥した。

重合体は、DSCで決定して溶融吸熱での168℃のピークを有し約100~180℃の溶融範囲を有していた。

#### 実施例 17

実施例16の酵母処理を反覆したが、培地Eの供給から培地Fの供給への切換えは、細胞重量が約8.5kgに達したときに行つた。培地Fは、114&/hrの割合で4時間供給してから8.2&/hrに

$H_3PO_4$ (1.1M)	1.2 ml
プロピオン酸	20g

細胞懸濁液を遠心分離で濃縮し、実施例15の方法で、重合体を濃縮細胞懸濁液から抽出した。

#### 実施例 18

実施例17の処理を大規模で反覆し、公称容積1000&の酵母器を用い、ほぼ等容量の培地DおよびEで500&マークまで満たした。この実施例では、培地Eの供給は細胞重量約4kgになつたときに25&/hrの割合で開始し、培地Fの供給は細胞重量約8kgになつたとき8.75&/hrの割合で開始した。培地EおよびFの供給は、細胞重量が約10kgに達するまで継続した。存在する同化性酵素の量は、重合体を含まぬ細胞約4.1kgまで微生物を繁殖させるに充分であつた。

#### 実施例 19

実施例19を反覆したが、培地Fの供給割合は25&/hrで、酵母は細胞重量約11kgになるまで継続した。この場合、同化性酵素の量は、重合体を含まぬ細胞約4kgまで微生物が繁殖するに充

低下させ、このレベルをさらに9時間維持し、この段階で細胞重量は約8.9kgであつた。

この実施例では、酵母器に存在した同化性酵素の量は、重合体を含まぬ細胞約1.5kgのみに微生物を繁殖させるに充分であつた。

細胞懸濁液を遠心分離で濃縮し、次いで実施例15の方法で、重合体を濃縮細胞懸濁液から抽出した。

#### 実施例 18

実施例16のようにして、250&酵母器に投入、接種を行つた。同化性酵素の量は、重合体を含まぬ細胞約1.9kgのみに、微生物を繁殖させるに充分であつた。実施例16のようにして、酵母を84℃、pH 6.8で好気的に行つた。

細胞重量が約1.0kgに達したとき、培地Dおよび培地Gをそれぞれ8.7&/hrおよび4.6&/hrの割合で供給を開始し、細胞重量が8.9kgになるまで継続した。

培地Gは、脱イオン水1&当り次の組成を有していた：

分であつた。

実施例16~20の重合体は、それぞれダ-ヒドロキシ酪酸(HB)単位およびダ-ヒドロキシバレンリン酸(HV)単位を含む共重合体であり、重量平均分子量は80000以上であつた。共重合体は、それぞれD(-)立体配置を有していた。

実施例16~20の各共重合体およびダ-ヒドロキシ酪酸モ重合体100重量部を、クロロホルム約10重量部およびタルク1重量部でスラリー化し、家庭用内ひき機で室温で粒状化した。次いで、組成物を乾燥してクロロホルムを除去し、180℃で押出してから、再び粒状化した。得られる粒状物を、185℃で試験用バーに射出成形し、型温度66℃および冷却時間20秒を用いた。引張特性を、ASTM D688-77aにより50mm/分の速度で測定し、衝撃強度をASTM D256-78によりアイソソフト衝撃試験で評価した。

結果を、第4表に示した。

第 4 表

実施例	HV/HBモル比		0.5%伸びの モジュラス <sup>*</sup> (GPa)	引 強 強 度 (MPa)	破断伸び (%)	アイゾント衝撃強度 (J/m)	
	G Cによる	N M Rによる				1 mmノンチ付	ノンチなし
1 6	1 8 / 8 2	2 0 / 8 0	1.4 7	2 5	1 0 - 8 1	6 6	4 6 3
1 7	4 / 9 6	6 / 9 4	2.9 8	8 3	6 - 7	2 8	1 4 0
1 8	8 / 9 2	7 / 9 8	2.1 0	8 1	1 4 - 1 9	1 0 6	4 0 8
1 9	1 / 9 9	4 / 9 6	2.7 0	8 5	8 - 1 4	6 6	1 9 1
2 0	4 / 9 6	4 / 9 6	2.4 8	8 5	8 - 1 5	2 8	1 4 0
ホモ重合体	0 / 1 0 0	0 / 1 0 0	8.2 6	4 0	6 - 1 8	6 5	1 1 5

## 実施例 21

下記成分を室温で乾式混合し、PVC配合物を作つた：

重量部	
(i) 塩化ビニルホモ重合体 (K62)	1 0 0
(ii) ジ-N-ジチオグリコール酸 エステルベースのチオオクチ ルスズ錠体の安定化剤	1.5
(iii) メチルメタクリレート/ブタ ジエン/スナレン PVC衝撃 改善剤	8
(iv) ワンクス (外部油滑剤)	0.8
(v) グリセリンモノエステル (内部油滑剤)	1
(vi) HB重合体 (加工助剤)	2

HB重合体加工助剤は、次のものであつた：

- (a) 実施例 2 で得たメヒドロキシ脂肪酸ホモ重合体
- (b) 実施例 7 の共重合体 (共重合体 A)
- (c) 実施例 1 6 の共重合体 (共重合体 B)

加工助剤は、約 10 % でスラリー化し、家庭用肉ひき機で室温で粒状化し、乾燥し、190°C

で溶融押出し、再度粒状化し、PVC乾燥混合物に配合する前に、粒子寸法 150 μm 以下に粉碎した。

乾燥混合物を、次のようにして試験した：

1 混合物 50 g を、5 kg の直通で負荷した圧力ラムの下で 1.8 rpm で回転し、180°C に維持した Brabender Plastograph の混合ヘッドに投入した。ゲル化が起きるに要した時間を、記録した。2 混合物を冷圧縮してキャンドルにし、これを 170°C に維持し、直径 1 mm およびランド長 20 mm の円形オリフィスを有するダイを取り付けた押出しレオメーターに接続した。接続物が 170°C に加熱された後、速度を増加させながら押出した。押出し物の外観を記録し、押出し物をダイから引張つて溶融伸長性を評価した。

結果を、第 6 表に示した。

第 5 表

加工助剤	180°C でのゲル化時間 (分)	170°Cでの押出し	
		外観	溶融伸長性
なし	1.2	低い押し出し速度でも荒いサメ肌	劣る
ホモ重合体	9.5	高速では波状はつきり見える外観の未溶融重合体あり、劣る	劣る
共重合体A	1.0	優秀、極めてスムース	良好
共重合体B	1.5	スムース、しかし時々未溶融粒子あり	極めて良好

この実施例は、塩化ビニル重合体加工助剤として、共重合体は、ターピドロキシ酸濃度ホモ重合体より優れていることを示している。ヨリランダムな共重合体Aは、明らかに共重合体Bより秀れている。

#### 実施例 22

培地Hを、次の組成で作つた：

を検査した。どのフラスコでも、微生物の繁殖は殆どなかつた。フラスコ内容物を一滴にし、遠心分離して細胞のペレットにして、オープンで乾燥してから計量した。ペレット重量は、2.81gであつた。接種物の細胞含有量も決定し、69.76%であつた。したがつて、接種物としてフラスコに添加した細胞の全重量は、2.79gであつた。

用いたメタクリル酸濃度では、この菌株は、メタクリル酸を同化しなかつた。

特開昭57-150393(18)

$(NH_4)_2SO_4$	1 g
$KH_2PO_4$	2 g
$(Na)_2HPO_4$	8 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
$CaCl_2$	0.01 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.005 g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.002 g
$Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$	0.1 g
$(NH_4)_2CO$	1.5 g
脱イオン水	全体で1lにする

培地のpHは、7であつた。

はじめメタクリル酸0.5 gを溶解した培地H 500 mlをそれぞれ含む8個の1l瓶とうフラスコに、*Nocardia salmonicolor*株ATCC 19149の種培養物5 mlを接種し、旋回振とう機上で32°Cで培養した。

接種後24時間、48時間および72時間の間隔で、各フラスコにメタクリル酸0.5 gづつを添加し、メタクリル酸0.25 gの最終添加を96時間後に行つた。接種後108時間で、各フラスト

#### 第1頁の続き

優先権主張 ②1981年7月7日③イギリス(G B)④8120991

⑦発明者 レオナード・フレデリック・ライト  
イギリス国クリープランド・ストックトン-オン-テイーズ・ノートン・ザ・グリーン・ノートン・ホール(番地なし)

特許出願人 インペリアル・ケミカル・インダストリーズ・ピーエルシー

代理人 井理士 湯浅恭三

(外2名)

## 特許法第17条の2の規定による補正の掲載

昭和 56 年特許願第 185153 号(特開 昭 57-150393 号、昭和 57 年 9 月 17 日発行 公開特許公報 57-1504 号掲載)については特許法第17条の2の規定による補正があつたので下記のとおり掲載する。 1 (1)

Int. C.I.	識別記号	府内整理番号
C12P 7/42		7236-4B
C08G 63/06		6904-4J

## 手 域 补 正 書

昭和 63年 11月 

特許庁長官 吉田文毅 殿

## 1 事件の表示

昭和 56年特許願第 185153 号

## 2 発明の名称

 $\beta$ -ヒドロキシブチレート共重合体およびその製造法

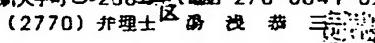
## 3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所

名 称 インペリアル・ケミカル・インダストリーズ・  
ビーエルシー

## 4 代 理 人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新大手町ビル206号室(電話 270-6641-6)  
氏 名 (2770)弁理士 

## 5 補正の対象

明細書の〔特許請求の範囲〕の欄



## 6 補正の内容

別紙の通り

方 式 

項の何れかに記載の共重合体。

(5) R', R' および R' がそれぞれ水素原子である特許請求の範囲第4項記載の共重合体。

(6) R' がエチル基である特許請求の範囲第1項ないし第5項の何れかに記載の共重合体。

(7) 重量平均分子量 200,000 以上を有する特許請求の範囲第1項ないし第6項の何れかに記載の共重合体。

(8) 繰返し単位を 1 ないし 40 モル % 含む特許請求の範囲第1項ないし第7項の何れかに記載の共重合体。

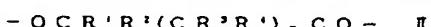
(9) ポリエステルを蓄積できる微生物を、水溶性、同化性炭素含有基質の水性培地で、培養の少なくとも一部は微生物繁殖の必須要件の一つまたはそれ以上を制限するがポリエステル蓄積を制限しない条件下で培養する熱可塑性ポリエステルの製造法において、培養を制限した期間の少なくとも一部の間で、基質がこの制限された条件下で微生物により繰返し単位 -OCH(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)CH<sub>2</sub>CO- のみとなる以外のポリエステルに代謝できる

(1) 特許請求の範囲を下記の通り補正する。

(1) 重量平均分子量 10,000 以上を有し、次の繰返し単位 I を 99.9 ないし 50 モル %



および次の繰返し単位 II を 0.1 ないし 50 モル %



(式中の n は 0 または 1、R', R', R' および R' はそれぞれ炭化水素基; ハローまたはヒドロキシ基; 構成化水素基; ヒドロキシ基; ハログン原子および水素原子から選択するが、n が 1 のときは R', R' および R' はそれぞれ水素原子で、R' はメチル基ではない)

を含む共重合体。

(2) n が 1 である特許請求の範囲第1項記載の共重合体。

(3) R', R', R' および R' はそれぞれ 4 個以下の炭素原子を含む基である特許請求の範囲第1項または第2項記載の共重合体。

(4) R', R', R' および R' の少なくとも一つが水素原子である特許請求の範囲第1項ないし第3

(8) - / -

平成 1. 3.13 発行

有機酸またはその塩よりなることを特徴とする方法。

(10) 酸をプロピオン酸、イソ酪酸およびアクリル酸より選択する特許請求の範囲第9項記載の方法。

(11) 微生物繁殖の必須要件の一つまたはそれ以上を制限するが、ポリエステル蓄積を制限しない条件下で、微生物の培養を行う期間の少なくとも一部のとき、酸を唯一の基質とする特許請求の範囲第9項または第10項記載の方法。

(12) 酸が微生物培養の全期間を通じての唯一の基質である特許請求の範囲第11項記載の方法。

(13) 基質として炭水化物を用いて微生物を繁殖させる特許請求の範囲第9項ないし第11項の何れかに記載の方法。

(14) 炭水化物がグルコースである特許請求の範囲第13項記載の方法。

(15) 培養が微生物繁殖の必須要件の一つまたはそれ以上を制限するが、ポリエステル蓄積を制限しない条件下である期間の少なくとも一部での基

質が、酸および炭水化物の混合物である特許請求の範囲第13項または第14項記載の方法。

(16) 制限する繁殖の必須要件であるがポリエステル蓄積には必須要件でないのは、窒素源である特許請求の範囲第9項ないし第15項の何れかに記載の方法。」

以上

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)